

SPRÁVNOST A PŘESNOST VÝSLEDKŮ PŘI MIKROBIOLOGICKÝCH ANALÝZÁCH VODY

RNDr. Dana Baudišová

Výzkumný ústav vodohospodářský TGM, PrahaÚvod

Výsledky mikrobiologických stanovení jsou charakterizovány relativně větším rozptylem než řada stanovení chemických a tato skutečnost může zbytečně degradovat hodnocení mikrobiologických ukazatelů. V současné době se však i do mikrobiologických laboratoří postupně zavádí systém správné laboratorní praxe a sleduje se jakost výsledků mikrobiologických analýz.

Metody mikrobiologického rozboru vody mají své zvláštnosti, dané kromě omezení stále vylepšovaných metod stanovení jako takových ještě dalšími faktory:

- Vzorek pro mikrobiologické stanovení je velmi nestabilní, je nutné jej zpracovat *maximálně* do 24 hodin a stanovení tudíž *nelze* v žádném případě opakovat. To může být problém především u neznámých vzorků povrchové vody, kdy je nutné zvolit správný stupeň ředění.
- Stanovené mikroorganismy (zde myšleno bakterie) jsou *diskrétní* jednotky, které se navíc mohou absorbovat na suspendované látky a jejich “rozložení” ve vzorku tudíž není homogenní.
- Bakterie a ostatní mikroorganismy jsou *živé*. Vodní prostředí je pro hygienicky významné mikrobiologické ukazatele zcela nefyziologické, proto mohou být stresované či fyziologicky poškozené a nemusejí vždy vykazovat vlastnosti typické pro hledanou skupinu. Navíc mohou být negativně ovlivněny přítomností dalších, např. toxických látek ve vzorku.
- Z výše uvedených důvodů nelze jednoduše převzít všechny metody k zabezpečení jakosti výsledků, používané např. v chemických laboratořích. Neznamená to však, že v mikrobiologii nelze tuto oblast alespoň částečně ošetřit, a tím zlepšit kvalitu práce při mikrobiologických analýzách vod.

V letošním roce byl podrobně zpracován příspěvek “Jakost práce v mikrobiologické laboratoři”, který podrobně hodnotí výsledky experimentů zaměřených na hledání největších zdrojů nepřesností při mikrobiologickém rozboru vody a použitelnost dostupných referenčních materiálů. Zde jsou podány shrnující informace, které mohou využít další pracovníci z vodohospodářské praxe.

Tabulka 1. Hlavní problémy stanovení koliformních a termotolerantních koliformních bakterií; minimální nepřesnosti jsou zde charakterizovány experimentálně stanovenými variačními koeficienty (tj. podílem rozptylů na průměrech)

Je nutno upozornit na to, že nebyly studovány *chyby* ve smyslu nedodržení předepsaných postupů a jiných nedostatků či lajdáctví, ale nepřesnosti metod jako takových za *přísného* dodržování předepsaných postupů.

Mikrobiologický rozbor vody – hlavní zdroje nepřesností

Stanovení koliformních a termotolerantních (fekálních) koliformních bakterií

Stanovení koliformních a termotolerantních koliformních bakterií bylo rozděleno na několik problémových okruhů, které jsou charakterizovány v *tabulce 1*. Každý problémový okruh byl studován zvlášť a v následující pasáži jsou podány hlavní výsledky.

Charakter vzorku

Tato problematika není přesně součástí mikrobiologického rozboru vzorku vody, již nesprávně odebraný vzorek však může být příčinou mezilaboratorních rozdílů. Z informací uvedených v úvodu vyplývá, že pro jakákoliv porovnávání výsledků (mezilaboratorních i vnitrolaboratorních) je nutno používat pouze vzorky *paralelní*. Ty musejí být získány z jednoho vzorku odebraného v jeden okamžik, z jednoho místa, do jedné vzorkovnice a poté za maximálního stupně homogenizace rozděleného na jednotlivé podíly.

Očkování vzorku

Očkování vzorku (včetně jeho homogenizace) je zdrojem největších nepřesností při mikrobiologickém rozboru vody. Toto bylo jednoznačně potvrzeno výsledky experimentů:

Byly stanoveny koliformní a termotolerantní koliformní bakterie, kdy jeden vzorek byl v devíti paralelách naočkován třemi pracovníky. Odečtení všech vzorků provedl jeden pracovník, aby byly vyloučeny další nepřesnosti. Zjistilo se, že při pečlivém promíchání vzorků podle předpisu a přesném pipetování vzorku (při použití skleněných pipet správného objemu) lze dosáhnout rozptylu mezi naočkovánými paralelami vyjádřeného hodnotou variačního koeficientu pod 10 %. Při nedbalé práci však variační koeficient může dosahovat hodnot až 50 % (!!).

Živné médium

Byl studován vliv živného média na záchyt koliformních a termotolerantních koliformních bakterií. K záchytu koliformních bakterií byl použit Endo agar, k záchytu termotolerantních koliformních bakterií agar mFC. Média byla připravena podle standardně užívaných předpisů, jednotlivé várky připravili tři různí pracovníci z jedné laboratoře. Kromě připravovatele se várky lišily stářím (za dodržení skladovacích předpisů), nebo např. použitou destilovanou vodou. Zjistilo se, že pokud jsou dodrženy všechny předpisy ohledně přípravy kultivačního média, toto prakticky neovlivňuje získané výsledky. Variační koeficient mezi výsledky ($n = 3 \cdot 10$) získanými na třech "různých" médiích byl 4 % u koliformních (Endo) i termotolerantních koliformních (mFC) bakterií.

Analýza rozptylu (Anova) prokázala, že výsledky koliformních bakterií na Endo, resp. termotolerantních koliformních bakterií na mFC jsou shodné ($F 0,651479$, resp. $0,191255$ F kritická $3,354131$).

Inkubace

Vliv inkubační teploty (resp. vliv kolísání teploty v předepsaném rozmezí) na záchyt koliformních a termotolerantních koliformních bakterií byl studován pomocí paralelní inkubace naočkováných vzorků ve dvou termostatech, u každého se předpokládá určité kolísání teploty podle deklarace výrobce, nemělo by však přesáhnout 1°C .

Nebyly zjištěny významné rozdíly mezi paralelními soubory ze dvou termostatů. Pro stanovení koliformních bakterií je předepsána inkubační teplota $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$. Variační koeficient mezi výsledky ze souborů z dvou termostatů byl pouze 2 %. Shodné výsledky prokázala i analýza rozptylu ($F 0,139064$ F kritická $4,300944$).

U stanovení termotolerantních koliformních bakterií byly navíc sledovány rozdílné inkubační teploty předepisované různými normami (ČSN 83 0531 a ISO 9308) 42–44 °C. I zde byly rozdíly velmi malé, při rozdílném nastavení o 2 °C se již rozdíl zvyšuje.

Odečítání výsledků

Vyhodnocování vykultivovaných kolonií a jejich odečítání (resp. rozhodování, patřili do hledané skupiny či nikoliv) je dalším významnějším zdrojem nepřesností při mikrobiologickém rozboru. To se v podstatě netýká analýzy vod pitných, kdy každá “podezřelá” kolonie by měla být dalšími testy ověřena. U povrchových vod to není vzhledem k jejich počtu možné. Výrazného snížení těchto nepřesností však lze dosáhnout použitím kultivačního média s lepší diferenciací schopností. Například při odečítání termotolerantních koliformních bakterií na médiu mFC byl variační koeficient mezi výsledky odečítanými různými pracovníky jen 4 %, zatímco na Endo agaru až 12 %.

Výpočty

Volba správného ředění a s tím související výpočet výsledku je jedním z hlavních problémů mikrobiologického rozboru vody. Tento problém se zásadně netýká mikrobiologického rozboru pitné vody, kdy je bakterií obecně málo a jsou předepsány objemy, ve kterých se má jejich počet stanovit. Při analýzách vod povrchových je však nutno odhadnout přesně ředění, ve kterém se má daný ukazatel hodnotit.

Podle platných ČSN, resp. ČSN ISO, se má vyhodnotit takový stupeň ředění, kdy je na plotnách při přímém výsevu hledaný mikroorganismus v počtech 30–300 ktj na misce, u membránové filtrace je rozmezí 10–100 ktj vzhledem k menší využití ploše. U vzorků neznámého znečištění (a to je vzhledem k sezonním a dalším výkyvům prakticky vždy) se proto musí provádět ředění několik (minimálně dvě, v řadě případů i tři a více), což stanovení samozřejmě časově a finančně zatěžuje. Situaci navíc komplikuje skutečnost, že analýza je neopakovatelná – vzorek se musí zpracovat a zlikvidovat do 24 h po odběru.

Nesprávné ředění kromě toho, že poskytuje relativně odlišné výsledky, významně zvyšuje jejich nepřesnost. Při stanovení podílu rozptylu na průměru (vyjádřené variačním koeficientem) u paralelních misek bylo zjištěno, že hodnota rozptylu je výrazně nižší u výsledků vypočítaných ze správného ředění.

Stanovení fekálních streptokoků – další zdroje nepřesností

Kvalitativní chyby

Stanovení fekálních streptokoků má dnes dva stupně: kultivaci vzorku na selektivním médiu s azidem sodným a TTC a konfirmaci typických kmenů testem na hydrolýzu eskulinu v prostředí žlučových solí. Konfirmační testy umožňují odlišení tzv. “pravých” fekálních streptokoků od dalších streptokoků, které nepocházejí ze střevního traktu a dříve způsobovaly falešně pozitivní výsledky, neboť též rostly na selektivním médiu s azidem sodným a TTC. Konfirmační testy je tedy dnes nutno důsledně provádět a odlišovat stanovení tzv. “presumptivních” (čili nejpravděpodobnějších či předběžně určených) a “pravých” fekálních streptokoků.

Kvantitativní chyby

Fekální streptokoky tvoří nejčastěji diplokoky, mohou se však spojovat i do řetízků. Je zde tedy výrazný rozdíl mezi počtem bakteriálních buněk a počtem kolonie tvořících jednotek. Žádnou závislost zde kvantifikovat nelze.

Růst fekálních streptokoků velmi citlivě reaguje na složení peptonu v živném médiu (nejlépe vyhovuje trypton). Při jejich stanovení tedy velmi záleží na typu použitého peptonu v živné půdě a i malá odchylka ve složení může snížit růst (a tedy i záchyt) fekálních streptokoků.

Stanovení mezofilních a psychofilních bakterií – další zdroje nepřesností

Kvalitativní chyby

Skupina mezofilních a psychofilních bakterií je velmi nesourodá skupina chemoheterotrofních bakterií uzančně vázaná ke složení kultivačního média. Jakákoliv jeho změna zachytí kvalitativně zcela odlišnou skupinu mikroorganismů (a konečný výsledek může být i kvantitativně odlišný).

Kvantitativní chyby

Mezofilní a psychofilní bakterie se podle platných ČSN stanovují přímým výsevem do kultivačního média a tato metoda poskytuje řadu nepřesností pouze omezeně ovlivnitelných:

Teplota roztopeného agarového média pro zalévání naočkovaných misek má mít teplotu maximálně 45 °C. Vzhledem k tomu, že médium musí zůstat sterilní, nelze teplotu při zalévání přesně zjistit a každá desetina stupně navíc nepříznivě působí na růst mezofilních a zejména psychofilních bakterií.

Pokud má médium naopak teplotu nižší, stává se viskóznějším a nelze zaručit jeho bezvadné promíchání se vzorkem.

Mezi mezofilní bakterie patří i sporulující bakterie, zejména zástupci rodu *Bacillus*. Pokud se ve vzorku vyskytnou, rostou v obřích koloniích, a i jedna kolonie může přerůst celou misku. Mezofilní bakterie potom nejdou buď spočítat vůbec, nebo je třeba volit tak vysoké ředění, které je pro správný výpočet výsledku nevhodné.

Opakovatelnost a reprodukovatelnost výsledků

Pro studium opakovatelnosti a reprodukovatelnosti výsledků byl proveden experiment analýz pěti bodových vzorků, které byly paralelně rozděleny pro dva pracovníky z laboratoře VÚV (každý pracovník provedl celé stanovení od začátku až do konce = opakovatelnost) a pro další anonymní laboratoř (reprodukovatelnost). Každý vzorek byl očkovan v pěti paralelních stanoveních (membránová filtrace, Endo agar). Výsledky ukázaly normální rozdělení, proto byly hodnoceny standardně pomocí směrodatných odchylek a variačních koeficientů.

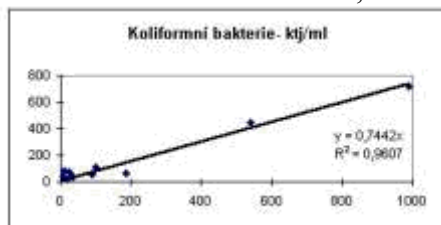
Při porovnávání výsledků dvou pracovníků z jedné laboratoře (VÚV) se variační koeficienty u koliformních bakterií pohybovaly od 3 do 29 %, u termotolerantních koliformních bakterií od 5 do 23 %.

Při porovnávání výsledků jednoho pracovníka z VÚV a pracovníka z jiné laboratoře se variační koeficienty u koliformních bakterií pohybovaly od 0 do 18 %, u termotolerantních koliformních bakterií od 1 do 11 %.

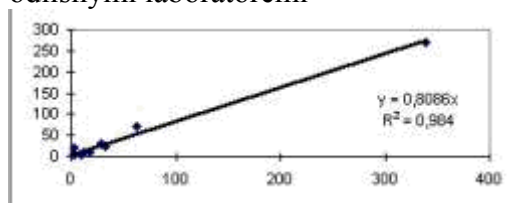
Vzhledem k tomu, že výsledky pracovníků ze stejné laboratoře jsou relativně horší než výsledky mezilaboratorní, potvrzuje se, že největší nepřesnosti při mikrobiologických analýzách jsou způsobeny osobními chybami pracovníků.

V následující části je demonstrována korelace výsledků 12 analýz koliformních a termotolerantních koliformních bakterií (Endo, přímý výsev), zpracovaných pracovníky dvou různých laboratoří. Vzorky nebyly paralelní, ale jednotlivě odebírané v jednom čase následně z jednoho profilu během roku. Regresní analýza ukázala vysokou korelaci výsledků z obou laboratoří (viz obrázky 1a a 1b). Korelační koeficienty se prakticky nesnížily ani po eliminaci dvou nejvyšších (tj. extrémních) hodnot.

Obr. 1a. Koliformní bakterie; lineární regrese výsledků stanovených odlišnými laboratořemi



Obr. 1b. Termotolerantní koliformní bakterie; lineární regrese výsledků stanovených odlišnými laboratořemi



Párový T-test na střední hodnotu prokázal, že výsledky obou laboratoří jsou shodné (t-stat. 0,787417 t krit. 2,262159). Variační koeficienty mezi jednotlivými párovými stanoveními však byly relativně vysoké (0–75 %!), u koliformních bakterií průměrně 29 %, u termotolerantních koliformních bakterií průměrně 23 %).

Použití referenčních materiálů v mikrobiologii vody

V současné době jsou dostupné dva typy referenčních materiálů, využitelné ke sledování jakosti práce v hydromikrobiologických laboratořích. V první řadě jde o referenční kultury poskytované Českou sbírkou mikroorganismů a v druhé řadě (významem však důležitější) jsou již dostupné první referenční materiály pro mikrobiologii s deklarovaným obsahem mikroorganismů, které lze využít i kvantitativně.

Referenční kultury mohou sloužit pouze ke kontrolám selektivity a rozlišovací schopnosti kultivačního média. Objednat lze řádově desítky (možná až stovky) druhů mikroorganismů na želatinových discích. Ty se pomnoží v neselektivním bujónu a vyrostlá kultura se očkuje na testované médium. Pro zhodnocení růstových vlastností kultury, a tudíž i vhodnosti použitého

média (jeho senzitivity a selektivity), lze využít metodu ekometrie (podrobněji viz Mossel et al. [6]).

První referenční materiály (dále RM) pro mikrobiologii jsou holandské (Bilthoven), v ČR dodávané firmou Chemnea. Jde o želatinové kapsle naplněné mléčným práškem, který je uměle kontaminován definovanou bakteriální kulturou na požadovanou denzitu. Přestože tyto referenční materiály jsou vhodnější pro potravinářskou mikrobiologii a pro analýzy vod mají určitá omezení, jsou významným krokem v možnostech kontroly jakosti práce. Jejich využitelnost a omezení při mikrobiologické analýze vod je naznačena v *tabulce 1*.

Nyní se již v holandských laboratořích (např. WATERLEIDING MAATSCHAPPIJ OVERIJSEL NW, Zwolle) začínají používat jako referenční materiály místo sbírkových kmenů v želatinových kapslích přímo vzorky vody zmrazené v isotonním médiu. Tyto materiály však nejsou komerčně k dispozici a jejich příprava je zatím výrobním tajemstvím.

Závěr

Mikrobiologický rozbor vod má svá specifika daná především nestabilitou vzorků s nemožností opakování analýz, diskrétní povahou mikroorganismů a různými fenotypy hledané mikroflóry dané výskytem v pro ně zcela nefyziologickém prostředí (např. povrchová či upravená voda). Přesto je možné při dodržování metod stanovení dosáhnout kvalitních výsledků. Při hodnocení výsledků základních mikrobiologických ukazatelů jakosti vody (stanovení koliformních a termotolerantních koliformních bakterií) je nutno počítat s rozptylem výsledků 25 %. Na rozptylu se nejvíce podílejí nepřesnosti při homogenizaci a pipetování vzorků a při odečítání výsledků. Metody lze částečně zpřesnit zavedením médií s lepší diferenciací schopností (např. mFC médium ke stanovení termotolerantních koliformních bakterií). Je nezbytně nutné při analýzách povrchových vod provést dostatečný počet ředění, aby bylo možné odečítat ty misky, kdy vyrostlo předepsané rozmezí kolonií, a to i za cenu zvýšení nákladů na analýzu.

V současné době je možné kontrolovat jakost práce v mikrobiologické laboratoři pomocí holandských referenčních materiálů (RM a CRM, Bilthoven); vhodné je též využít výsledků mezilaboratorních porovnání.

Literatura

- [1] Baudišová, D., Benáková, I., Zajícová, P.: Jakost práce v mikrobiologické laboratoři (správnost a přesnost výsledků). Zpravodaj pro hydroanalytické laboratoře 26,17 s., v tisku.
- [2] ČSN ISO 8199 (75 78 10): Obecné pokyny pro stanovení mikroorganismů kultivačními metodami. 1994.
- [3] Drašar, V., Žilková, J., Holendová, E.: Operativní řízení jakosti mikrobiologických metod pomocí holandských RM. In: Häusler J. (Ed): Nové metody mikrobiologického rozboru vod. ČSMS Komise mikrobiologie vody, Lučina u Frýdku-Místku, 18.–19. září 1997, s. 68–74.
- [4] EAL- G18. Akreditace laboratoří provádějících mikrobiologická zkoušení. Kvalimetrie V. Řada příruček pro laboratoře, ČSNI, 1996.
- [5] Häusler, J.: Mikrobiologické kultivační metody kontroly jakosti vod. Díl II. Mikrobiologický rozbor vod. Ministerstvo zemědělství České republiky, 1994.
- [6] Mossel, D. A. A. et al.: Quality assurance of selective culture media for bacteria, moulds and yeasts: an attempt at standardization at the international level. Journal of Appl. Bacteriology 54(3): 313–327, 1983.
- [7] Suchánek, M. (Ed.): Validace analytických metod. Kvalimetrie VII. Řada příruček pro laboratoře, Eurachem-ČR, 1997.

